

# Génétique et systématique évolutives du complexe d'espèces *Sphaeroma hookeri* Leach, *Sphaeroma levii* Argano et *Sphaeroma rugicauda* Leach (Crustacés, Isopodes Flabellifères)

## 1. Génétique formelle de onze locus enzymatiques

M. LAULIER

Université du Maine, Faculté des Sciences, Laboratoire de Biologie Animale,  
72017 Le Mans Cedex, France

### Résumé

Le déterminisme génétique de six activités enzymatiques (fumarase FU, malate déshydrogénases MDH, glucose phosphate isomérase GPI, phosphatases ALPH, estérases EST, amylases AMY), a été analysé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. L'interprétation repose sur l'analyse de descendances issues de croisements intra- et interspécifiques entre espèces du genre *Sphaeroma* : *S. levii*, *S. rugicauda* et sous-espèces : *S. hookeri hookeri* et *S.h. méditerranéea*. Selon le type d'activité considéré, les résultats démontrent l'existence d'un ou de plusieurs locus : FU, 1 locus monomorphe, GPI : 1 locus polymorphe, MDH : 2 locus monomorphes, ALPH : 2 locus polymorphes, AMY : 2 locus polymorphes liés, EST : 3 locus polymorphes. L'observation d'hétérozygotes permet des inférences quant à la structure quaternaire de l'enzyme active : monomérique pour les amylases et une estérase, dimérique pour la glucose phosphate isomérase, les phosphatases et une estérase.

*Mots clés* : Crustacés, Isopodes, *Sphaeroma*, génétique formelle, isozymes.

### Summary

*Evolutionary genetics and systematics of the complex of species Sphaeroma hookeri Leach, Sphaeroma levii Argano and Sphaeroma rugicauda Leach (Crustacea, Isopoda Flabellifera). 1. Formal genetics of eleven enzymatic loci*

Genetic segregations for six enzymatic activities (fumarase FU, malate dehydrogenase MDH, phosphoglucose isomerase GPI, phosphatases ALPH, esterases EST, amylases AMY) were studied by electrophoresis on polyacrylamide gels in intra and interspecific progenies of the species *Sphaeroma levii*, *S. rugicauda* and the two sub-species of *S. hookeri* : *S.h. hookeri* and *S.h. mediterranea*. The loci identified were found to be monomorphic (FU, MDH<sub>1</sub>, MDH<sub>2</sub>) or polymorphic (GPI, ALPH<sub>1</sub>, ALPH<sub>2</sub>, AMY<sub>1</sub>, AMY<sub>2</sub>, EST<sub>1</sub>, EST<sub>2</sub> and EST<sub>3</sub>). The loci AMY<sub>1</sub> and AMY<sub>2</sub> are linked. The occurrence of heterozygotes allowed inferences on quaternary structure of the active enzyme.

*Key words* : Crustacea, Isopoda, *Sphaeroma*, formal genetics, isozymes.

## I. Introduction

L'existence de peuplements monospécifiques ou hétérospécifiques, la répartition géographique et écologique ainsi que la possibilité d'obtenir des hybrides interspécifiques dans les conditions expérimentales (LEJUEZ, 1966) font du complexe d'espèces *Sphaeroma rugicauda* (*S.r.*) et *S. levii* (*S.l.*) et des sous-espèces *S. hookeri hookeri* (*S.h.h.*) et *S.h. mediterranea* (*S.h.m.*) un matériel favorable pour les études de génétique écologique, l'analyse de la variation géographique, la compréhension des relations phylogénétiques ainsi que pour l'évaluation du taux d'hybridation naturelle. Afin d'établir les bases génétiques utilisables pour la résolution de ces problèmes, nous avons étudié le déterminisme génétique de 6 activités enzymatiques (fumarase, malate déshydrogénases, phosphatases, glucose phosphate isomérase, estérases et amylases).

L'interprétation génétique repose sur l'analyse des descendances obtenues au laboratoire à partir de géniteurs provenant de peuplements monospécifiques. Cette démarche a été mise en œuvre chez les Crustacés par plusieurs auteurs (LOMHOLT & CHRISTENSEN, 1970 ; BARLOW & RIDGWAY, 1971 ; SOLIGNAC & CARIOU, 1974 ; BISOL *et al.*, 1977 ; CARIOU, 1977 ; SASSAMAN, 1979 ; BISOL *et al.*, 1981 ; RUVINSKY & LOBKOV, 1981 ; LEGRAND-HAMELIN *et al.*, 1982 ; GILARD, 1984 ; BOROWSKY *et al.*, 1985 ; OXFORD, 1986).

## II. Matériel et méthodes

### A. Elevage

Les couples constitués d'individus appartenant à la même espèce ou à des espèces différentes ainsi que leurs descendances sont élevés au laboratoire dans des conditions standards (LEJUEZ, 1966). Les géniteurs proviennent des stations de Luc-sur-Mer et Roscoff (*S.l.*), Graye-sur-Mer (*S.r.*), canal de Caen à la mer (*S.h.h.*) et de Camargue (*S.h.m.*). La mort des mâles après la fécondation et des femelles après la ponte ne permet pas leur étude enzymatique. Leur phénotype présumé a été établi à partir des principes classiques d'interprétation des zymogrammes, en tenant compte des phénotypes observés dans les populations et les descendances. Quelques descendances de femelles fécondées dans la nature ont été analysées.

### B. Electrophorèse

Les animaux sont broyés dans un broyeur de Potter réfrigéré ou manuellement dans un mortier. Le volume final de solution (1/2 tampon utilisé pour l'électrophorèse + 1/2 solution de saccharose à 40 %) varie entre 80 et 100  $\mu$ l en fonction de la taille du Sphérome. Les migrations sont réalisées sur gel de polyacrylamide. Le système est décrit par MAURER (1971, système n° 1, p. 44-45). Quelle que soit la concentration en acrylamide, le rapport acrylamide bis-acrylamide est constant. La distance de migration est de 5 à 6 cm sauf pour les amylases (migrations de 9 à 10 cm). L'intensité

TABLEAU 1  
Techniques de révélation des différentes activités enzymatiques  
Staining conditions of enzymes assayed

Enzyme	V	[C]	Tampon de coloration	Substrat	Coenzyme	Colorants	Activateur	Enzyme intermédiaire	Remarques
MDH Malate déshydrogénase	$\frac{1}{4}$	7,5	Phosphate 0,1 M, pH 6,5	Acide malique : 0,035 M	NAD : 0,0015 M	PMS : 0,00065 M MTT : 0,0025 M			
FU Fumarase	$\frac{1}{4}$	10	Phosphate disodique 0,01 M	Fumarate de sodium : 0,0025 M	NAD : 0,0025 M	PMS : 0,00055 M MTT : 0,0012 M		MDH : 7,5 UI/ml	
GPI Glucose phosphate isomérase	$\frac{1}{30}$	7,5	Tris HCl 0,1 M, pH 8	Fructose-6- phosphate : 0,004 M	NADP : 0,00013 M	PMS : 0,0001 M MTT : 0,0005 M	MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O 0,004 M	Glucose 6 phosphate déshydrogénase : 0,7 UI/ml	
ALPH Phosphatases alcalines	$\frac{1}{1}$	7,5 et 10	Tris HCl 0,5 M, pH 9,5	α-Naphthyl phosphate : 0,0066 M		Fast Blue BB : 1,2 mg/ml			
AMY Amylases	$\frac{1}{30}$	7,5 10 12,5 15		Préincubation 5 min dans l'empois d'amidon à 1 g/100 ml		(I + IK) : coloration négative	NaCl ou KCl 0,1 M		Incubation 20 min à 35 °C dans NaCl 0,1 M
EST Estérases	$\frac{1}{2}$	7,5 10 15	Phosphate 0,1 M, pH 6,5	α- ou β-Naphthyl acétate : 0,00011 M		Fast Blue BB : 0,6 mg/ml			Préincubation 45 min dans l'acide borique 0,5 M α- ou β-Naphthyl acétate ou solution acétonique à 2 %

V = volume de l'échantillon par rapport au volume total du broyat obtenu à partir d'un individu ; C = concentration en acrylamide ; NAD = nicotinamide- adénine dinucléotide ; NADP = nicotina-  
mide adénine dinucléotide phosphate ; PMS = phénazine méthosulfate ; MTT = 3-(4,5 diméthyl-thiazolyl)-2,5-diphényl tétrazolium ; MDH = malate déshydrogénase.  
V = volume of deposit used for revelation in comparison with total volume of homogenate obtained from an individual ; C = concentration in acrylamid ; NAD = nicotinamide adenine dinucleotide ;  
NADP = nicotinamide adenine dinucleotide phosphate ; PMS = phenazine methosulfate ; MTT = 3-(4,5 dimethylthiazolyl)-2,5 diphenyl tetrazolium ; MDH = malate dehydrogenase.

est constante (3mA par tube). Les techniques de révélation (tableau 1) sont inspirées de BREWER (1970), MAURER (1971), SHAW & PRASAD (1970), KERAMBRUN (1974) et CARIOU (1977). La technique de HEDRICK & SMITH (*in* MAURER, p. 19-20, 1971) a permis de comparer l'encombrement moléculaire de quelques isozymes.

### C. Nomenclature

Si plusieurs isozymes sont révélées, le système le plus éloigné du dépôt porte le n° 1, les autres, des valeurs croissantes.

La dénomination numérique des allèles en fonction de la mobilité électrophorétique des protéines qu'ils codent a été adoptée. L'allèle de référence (100) correspond à celui observé le plus fréquemment chez les *S.h. hookeri*.

## III. Résultats et interprétation

### A. Fumarase (FU)

Quel que soit le type de croisement (6 intraspécifiques, 4 interspécifiques), les 60 individus présentent un zymogramme identique : présence d'une seule bande de position constante qui ne permet aucune inférence quant à la structure quaternaire de l'enzyme. Ces observations sont interprétées comme le résultat de l'action d'un seul locus au niveau duquel un seul allèle a été révélé.

### B. Malate déshydrogénases (MDH)

Quel que soit le type de croisement (4 intraspécifiques, 4 interspécifiques), les 46 descendants présentent le même zymogramme caractérisé par l'existence de 2 fractions actives invariables. Dans l'hypothèse la plus simple, on admettra l'existence d'au moins 2 locus enzymatiques  $MDH_1$  et  $MDH_2$  comportant chacun un seul allèle.

### C. Phosphatases (ALPH)

La modification des conditions de révélation des phosphatases démontre que l'ensemble des fractions réagit en milieu acide et alcalin. Les zymogrammes étant plus colorés dans le second cas, nous les qualifierons de phosphatases alcalines.

Quelle que soit l'espèce ou la sous-espèce, le zymogramme présente deux zones d'activité (fig. 1, gels 1 à 5). Le locus  $ALPH_1$  se caractérise par une coloration intense et l'absence de polymorphisme intraspécifique ;  $ALPH_2$ , moins coloré, est polymorphe.

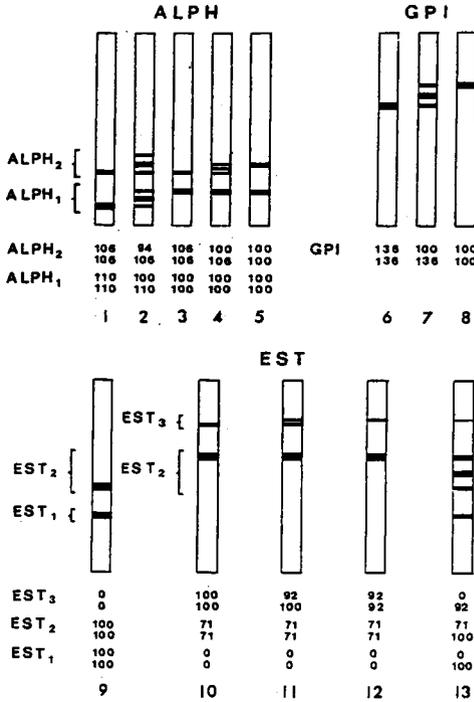


FIG. 1

Représentation schématique de zymogrammes obtenus pour différents systèmes enzymatiques (migrations anodiques). Les génotypes correspondants à chaque phénotype sont indiqués : ALPH = phosphatases alcalines, GPI = glucose phosphate isomérase, EST = estérases.

Diagram of zymograms obtained for different enzymatic systems (anodic migrations). Examples of phenotypes and genetic interpretation.

ALPH = alkaline phosphatases, GPI = phosphoglucose isomerases, EST = esterases.

a) Locus ALPH<sub>1</sub>

L'analyse de 8 croisements intraspécifiques (35 jeunes) ou hétérospécifiques *hookeri* × *rugicauda* (7 croisements, 27 descendants), met en évidence l'absence de phénotype nouveau. On observe une seule fraction active (fig. 1, gels 1, 3, 4, 5). Chez les hybrides *hookeri* × *levii* et *rugicauda* × *levii* (8 croisements, 22 descendants), on observe un phénotype à 3 bandes (fig. 1, gel 2). Une des bandes est caractéristique de *S.l.*, une autre commune à *S.h.* et *S.r.* et la 3<sup>e</sup> intermédiaire. Le système ALPH<sub>1</sub> est monomorphe à l'intérieur des espèces et comporte deux allèles codominants, l'allèle 110 étant fixé chez *S.l.* et 100 chez *S.h.* et *S.r.* L'existence de trois bandes chez les hybrides hétérozygotes indique une structure dimérique de la protéine active.

b) Locus ALPH<sub>2</sub>

On observe 2 catégories d'individus possédant soit 1 bande (fig. 1, gels 1, 3, 5) soit 3 (fig. 1, gels 2, 4). L'activité plus forte de la fraction intermédiaire et la localisation

des bandes extrêmes conduisent à admettre que les individus à 3 bandes sont des hétérozygotes et la molécule active un dimère.

La variabilité des phénotypes observée dans les croisements (tableau 2) s'explique par l'intervention d'un locus dont les 3 allèles 106, 100 et 94 sont codominants.

TABLEAU 2

*ALPH<sub>2</sub>* : distribution des phénotypes dans les descendance et phénotypes parentaux présumés  
*ALPH<sub>2</sub>* : segregation in progeny and presumed parental phenotypes

Croisements ♀ × ♂	Nombre de croisements	Distribution et phénotypes des descendants	Phénotypes parentaux présumés
l × l	2	8 ALPH <sub>2</sub> 106	ALPH <sub>2</sub> 106 × ALPH <sub>2</sub> 106
r × r	1	6 ALPH <sub>2</sub> 106	ALPH <sub>2</sub> 106 × ALPH <sub>2</sub> 106
hh × hh	1	4 ALPH <sub>2</sub> 94/100	ALPH <sub>2</sub> 100 × ALPH <sub>2</sub> 94
	1	4 ALPH <sub>2</sub> 100	ALPH <sub>2</sub> 100 × ALPH <sub>2</sub> 100
	2	4 ALPH <sub>2</sub> 100	ALPH <sub>2</sub> 100 × ALPH <sub>2</sub> 94/100
		4 ALPH <sub>2</sub> 94/100	
	1	1 ALPH <sub>2</sub> 100	
	2 ALPH <sub>2</sub> 94	ALPH <sub>2</sub> 94/100 × ALPH <sub>2</sub> 94/100	
	2 ALPH <sub>2</sub> 94/100		
hh × l	2	9 ALPH <sub>2</sub> 100/106	ALPH <sub>2</sub> 100 × ALPH <sub>2</sub> 106
l × hh	4	9 ALPH <sub>2</sub> 100/106	ALPH <sub>2</sub> 106 × ALPH <sub>2</sub> 100
	1	1 ALPH <sub>2</sub> 100/106	ALPH <sub>2</sub> 106 × ALPH <sub>2</sub> 94/100
	1	1 ALPH <sub>2</sub> 94/106	
hh × r	3	12 ALPH <sub>2</sub> 100/106	ALPH <sub>2</sub> 100 × ALPH <sub>2</sub> 106
	1	1 ALPH <sub>2</sub> 100/106	ALPH <sub>2</sub> 94/100 × ALPH <sub>2</sub> 106
	1	1 ALPH <sub>2</sub> 94/106	
r × hh	1	2 ALPH <sub>2</sub> 100/106	ALPH <sub>2</sub> 106 × ALPH <sub>2</sub> 100
	2	6 ALPH <sub>2</sub> 100/106	ALPH <sub>2</sub> 106 × ALPH <sub>2</sub> 94/100
	5 ALPH <sub>2</sub> 94/106		
l × r	1	2 ALPH <sub>2</sub> 106	ALPH <sub>2</sub> 106 × ALPH <sub>2</sub> 106

hh = *S. hookeri hookeri* ; l = *S. levii* ; r = *S. rugicauda*.

#### D. Glucose phosphate isomérase (GPI)

Il existe, comme pour les phosphatases, deux catégories de phénotypes : présence d'une ou de 3 fractions actives (fig. 1, gels 6 à 8). La similitude des observations conduit au même type d'interprétation. Les homozygotes possèdent une bande et les hétérozygotes 3. La structure de la molécule active est dimérique. Les phénotypes observés dans les descendance (tableau 3) sont compatibles avec l'existence de 4 allèles 157, 136, 114 et 100.

TABEAU 3

GPI : distribution des phénotypes dans les descendance et phénotypes parentaux présumés  
 GPI : segregation in progeny and presumed parental phenotypes

Croisements ♀ × ♂	Nombre de croisements	Distribution et phénotypes des descendants	Phénotypes parentaux présumés
hh × hh	1	4 GPI 114	GPI 114 × GPI 114
	1	2 GPI 100	GPI 100 × GPI 100/136
		5 GPI 100/136	
hh × hm	1	2 GPI 114	GPI 100/114 × GPI 114
		2 GPI 100/114	
	1	3 GPI 136	GPI 114/136 × GPI 114/36
		1 GPI 114	
l × l	1	2 GPI 114/136	
		6 GPI 136	GPI 136 × GPI 136
r × r	1	3 GPI 157	
		2 GPI 136	GPI 136/157 × GPI 136/157
hh × r	1	2 GPI 136/157	GPI 100 × GPI 136
		5 GPI 100/136	
	2	2 GPI 136	GPI 136 × GPI 136/157
r × hh		2 GPI 136/157	
	2	11 GPI 100/136	GPI 136 × GPI 100

Abréviations identiques au tableau 2 et hm = *S.h. mediterranea*.  
 Abbreviations as table 2 and hm = *S.h. mediterranea*.

E. Estérases (EST)

Les résultats des croisements ont permis d'identifier 3 locus (LAULIER, 1981).

a) Locus *EST*<sub>1</sub>

L'allèle 100 est caractéristique de *S.h.* et *S.r.* (fig. 1, gel 9) et l'allèle nul, 0, de *S.l.* (fig. 1, gels 10, 11, 12). Chez les hétérozygotes 100/0 (fig. 1, gel 13) l'activité est réduite.

b) Locus *EST*<sub>2</sub>

L'allèle 100 est commun à *S.h.* et *S.r.* (fig. 1, gel 9) et l'allèle 75 caractéristique de *S.l.* (fig. 1, gels 10, 11, 12). Les hybrides interspécifiques à 3 bandes (*hookeri-levii* et *rugicauda-levii*) indiquent une structure dimérique de l'enzyme active (fig. 1, gel 13).

c) Locus *EST*<sub>3</sub>

Chez *S.l.*, des phénotypes à 2 bandes (fig. 1, gel 11) ou une seule bande (fig. 1, gels 10 et 12) ont été observés. Chez *S.h.* et *S.r.*, il y a absence d'activité. Il existerait 3 allèles 100, 92 et 0 ou allèle nul.

F. *Amylases (AMY)*

Deux zones présentant une forte activité amylasique ont été étudiées. L'existence de variations indépendantes au niveau de chacune de ces zones et les résultats des croisements conduisent à admettre l'existence de 2 locus,  $AMY_1$  et  $AMY_2$ , caractérisés chacun par des phénotypes à 1 ou 2 bandes.

Dans le cas des phénotypes à 2 bandes, chacune migre au niveau de fractions caractéristiques de phénotypes à 1 bande. Ceux-ci correspondent aux homozygotes (fig. 2, gel 1,  $AMY_1$ ), ceux à 2 bandes (fig. 2, gels 2, 3, 4, 5, 6) aux hétérozygotes. L'enzyme active serait un monomère.

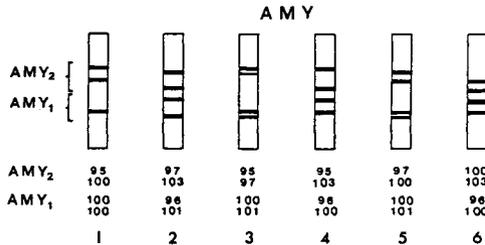


FIG. 2

*Représentation schématique de zymogrammes obtenus pour les deux systèmes amylasiques (migrations anodiques). Les génotypes correspondants à chaque phénotype sont indiqués.*

*Diagram of zymograms obtained for both amylasic systems (anodic migrations).*

L'analyse des croisements (tableau 4) confirme ces hypothèses et montre que chaque système est sous la dépendance d'un gène présentant plusieurs allèles codominants. Le locus  $AMY_1$  comporte 4 allèles 101, 100, 99 et 96 identifiés dans les croisements et le locus  $AMY_2$ , 5 allèles 103, 99, 98, 97 et 95.

*Liaison  $AMY_1$ ,  $AMY_2$  : encombrement moléculaire*

Dans plusieurs descendance (tableau 4, croisements \*), on note l'absence de certains phénotypes attendus en cas de ségrégation indépendante. Le nombre limité de descendants n'exclut pas la disparition par simple hasard de certaines catégories mais la liaison des locus  $AMY_1$  et  $AMY_2$  reste l'interprétation la plus vraisemblable. Le caractère absolu de cette liaison reste à démontrer.

La technique de HEDRICK & SMITH a permis de mettre en évidence l'identité d'encombrement moléculaire des différentes isozymes amylasiques.

TABLEAU 4

*AMY<sub>1</sub> et AMY<sub>2</sub> : distribution des phénotypes dans les descendancees et phénotypes parentaux présumés*  
*AMY<sub>1</sub> et AMY<sub>2</sub> : segregation in progeny and presumed parental phenotypes*

Croisements ♀ × ♂	Nombre de croisements	Distribution et phénotypes des descendants	Phénotypes parentaux présumés	
hh × hh	4	27 AMY <sub>1</sub> 100 AMY <sub>2</sub> 95/99	AMY <sub>1</sub> 100 AMY <sub>2</sub> 99 × AMY <sub>1</sub> 100 AMY <sub>2</sub> 95	
	2	25 AMY <sub>1</sub> 100 AMY <sub>2</sub> 99 16 AMY <sub>1</sub> 100 AMY <sub>2</sub> 95/99	AMY <sub>1</sub> 100 AMY <sub>2</sub> 99 × AMY <sub>1</sub> 100 AMY <sub>2</sub> 95/99	
	1	12 AMY <sub>1</sub> 100 AMY <sub>2</sub> 95 4 AMY <sub>1</sub> 100 AMY <sub>2</sub> 95/99	AMY <sub>1</sub> 100 AMY <sub>2</sub> 95 × AMY <sub>1</sub> 100 AMY <sub>2</sub> 95/99	
	hh × hm	1	9 AMY <sub>1</sub> 96/100 AMY <sub>2</sub> 98/99	AMY <sub>1</sub> 100 AMY <sub>2</sub> 99 × AMY <sub>1</sub> 96 AMY <sub>2</sub> 98
l × l	1	9 AMY <sub>1</sub> 100 AMY <sub>2</sub> 99	AMY <sub>1</sub> 100 AMY <sub>2</sub> 99 × AMY <sub>1</sub> 100 AMY <sub>2</sub> 99	
	1	3 AMY <sub>1</sub> 99/100 AMY <sub>2</sub> 97/99	AMY <sub>1</sub> 99 AMY <sub>2</sub> 99 × AMY <sub>1</sub> 100 AMY <sub>2</sub> 97	
	1	2 AMY <sub>1</sub> 99/100 AMY <sub>2</sub> 97/99 1 AMY <sub>1</sub> 99 AMY <sub>2</sub> 97/99	AMY <sub>1</sub> 99 AMY <sub>2</sub> 99 × AMY <sub>1</sub> 99/100 AMY <sub>2</sub> 97	
	1	1 AMY <sub>1</sub> 100 AMY <sub>2</sub> 99 1 AMY <sub>1</sub> 100 AMY <sub>2</sub> 97 1 AMY <sub>1</sub> 100 AMY <sub>2</sub> 97/99	AMY <sub>1</sub> 100 AMY <sub>2</sub> 97/99 × AMY <sub>1</sub> 100 AMY <sub>2</sub> 97/99	
	r × r	2	8 AMY <sub>1</sub> 96 AMY <sub>2</sub> 103	AMY <sub>1</sub> 96 AMY <sub>2</sub> 103 × AMY <sub>1</sub> 96 AMY <sub>2</sub> 103
		3	14 AMY <sub>1</sub> 96/101 AMY <sub>2</sub> 97/103	AMY <sub>1</sub> 101 AMY <sub>2</sub> 97 × AMY <sub>1</sub> 96 AMY <sub>2</sub> 103
2*		5 AMY <sub>1</sub> 96 AMY <sub>2</sub> 103 5 AMY <sub>1</sub> 96/101 AMY <sub>2</sub> 97/103	AMY <sub>1</sub> 96 AMY <sub>2</sub> 103 × AMY <sub>1</sub> 96/101 AMY <sub>2</sub> 97/103	
1*		4 AMY <sub>1</sub> 101 AMY <sub>2</sub> 97 2 AMY <sub>1</sub> 96/101 AMY <sub>2</sub> 97/103	AMY <sub>1</sub> 101 AMY <sub>2</sub> 97 × AMY <sub>1</sub> 96/101 AMY <sub>2</sub> 97/103	
hh × l		1	4 AMY <sub>1</sub> 99/100 AMY <sub>2</sub> 97/99	AMY <sub>1</sub> 100 AMY <sub>2</sub> 99 × AMY <sub>1</sub> 99 AMY <sub>2</sub> 97
l × hh	1	6 AMY <sub>1</sub> 100 AMY <sub>2</sub> 99	AMY <sub>1</sub> 100 AMY <sub>2</sub> 99 × AMY <sub>1</sub> 100 AMY <sub>2</sub> 99	
	1	3 AMY <sub>1</sub> 99/100 AMY <sub>2</sub> 97/99	AMY <sub>1</sub> 99 AMY <sub>2</sub> 97 × AMY <sub>1</sub> 100 AMY <sub>2</sub> 99	
hh × r	1*	5 AMY <sub>1</sub> 96/100 AMY <sub>2</sub> 95/103 2 AMY <sub>1</sub> 100/101 AMY <sub>2</sub> 95/97	AMY <sub>1</sub> 100 AMY <sub>2</sub> 95 × AMY <sub>1</sub> 96/101 AMY <sub>2</sub> 97/103	
	1*	5 AMY <sub>1</sub> 96/100 AMY <sub>2</sub> 97/99 2 AMY <sub>1</sub> 100/101 AMY <sub>2</sub> 97/99	AMY <sub>1</sub> 100 AMY <sub>2</sub> 99 × AMY <sub>1</sub> 96/101 AMY <sub>2</sub> 97/103	
	1*	2 AMY <sub>1</sub> 100/101 AMY <sub>2</sub> 97/99 2 AMY <sub>1</sub> 96/100 AMY <sub>2</sub> 99/103	AMY <sub>1</sub> 100 AMY <sub>2</sub> 99 × AMY <sub>1</sub> 96/101 AMY <sub>2</sub> 97/103	
	r × hh	2	11 AMY <sub>1</sub> 96/100 AMY <sub>2</sub> 99/103	AMY <sub>1</sub> 96 AMY <sub>2</sub> 103 × AMY <sub>1</sub> 100 AMY <sub>2</sub> 99
		1	5 AMY <sub>1</sub> 96/100 AMY <sub>2</sub> 95/103	AMY <sub>1</sub> 96 AMY <sub>2</sub> 103 × AMY <sub>1</sub> 100 AMY <sub>2</sub> 95
2*		5 AMY <sub>1</sub> 100/101 AMY <sub>2</sub> 97/99 4 AMY <sub>1</sub> 96/100 AMY <sub>2</sub> 99/103	AMY <sub>1</sub> 101 AMY <sub>2</sub> 97/103 × AMY <sub>1</sub> 100 AMY <sub>2</sub> 99	
l × r	2	6 AMY <sub>1</sub> 100/101 AMY <sub>2</sub> 97	AMY <sub>1</sub> 100 AMY <sub>2</sub> 97 × AMY <sub>1</sub> 101 AMY <sub>2</sub> 97	
	1	2 AMY <sub>1</sub> 99/101 AMY <sub>2</sub> 97/99 1 AMY <sub>1</sub> 99/101 AMY <sub>2</sub> 97	AMY <sub>1</sub> 99 AMY <sub>2</sub> 97/99 × AMY <sub>1</sub> 101 AMY <sub>2</sub> 97	

Abréviations identiques aux tableaux 2 et 3 ; \* descendancees indiquant la liaison des locus AMY<sub>1</sub> et AMY<sub>2</sub>.  
 Abbreviations as tables 2 and 3 ; \* progenies indicating the linkage AMY<sub>1</sub>, AMY<sub>2</sub>.

## IV. Discussion

Les travaux concernant l'analyse enzymatique du genre *Sphaeroma* sont peu nombreux (KERAMBRUN, 1970, 1974, 1975 a et b ; CACCONE *et al.*, 1978 ; SBORDONI *et al.*, 1980 ; EDWARDS & HEATH, 1983 a et b ; LAULIER & LEJUEZ, 1976, 1977 ; LAULIER, 1979, 1981, 1984) et seuls les résultats de EDWARDS & HEATH reposent sur une analyse de descendance.

Bien que les comparaisons soient limitées en raison de la variabilité des supports (amidon : EDWARDS & HEATH, CACCONE *et al.*, SBORDONI *et al.*, acrylamide : KERAMBRUN, LAULIER, LAULIER & LEJUEZ), quelques remarques s'imposent.

— MDH : pour CACCONE *et al.* chez *S.h.m.*, il n'existerait qu'un locus polymorphe ce qui ne concorde pas avec nos observations (2 locus monomorphes).

— ALPH : contrairement à nos résultats et à ceux de KERAMBRUN, CACCONE *et al.* décrivent chez *S.h.m.* 2 locus pour les phosphatases acides et 1 pour les alcalines, tous polymorphes. Selon KERAMBRUN, il existe 2 fractions phosphatasiques majeures présentant un dimorphisme sexuel que nous n'avons pas observé.

— GPI : CACCONE *et al.* observent 1 locus polymorphe chez *S.h.m.*, et chez *S.r.*, EDWARDS & HEATH décrivent un système diallélique. La présence de 3 fractions chez les hétérozygotes conduit ces auteurs, comme nous-mêmes, à attribuer à cette enzyme une structure dimérique.

— EST : chez *S.h.m.*, KERAMBRUN décrit 2 fractions majeures, CACCONE signale l'existence de 3 locus dont 2 monomorphes. Les 2 fractions observées par KERAMBRUN et les locus monomorphes analysés par CACCONE pourraient correspondre aux locus EST<sub>1</sub> et EST<sub>2</sub> que nous décrivons chez *S.h.*, le 3<sup>e</sup> locus de CACCONE correspondant à une des nombreuses fractions estérasiques décrites par KERAMBRUN.

— AMY<sub>1</sub>, AMY<sub>2</sub> : contrairement aux locus précédents, les amylases n'ont fait l'objet d'aucune étude chez les Sphéromes. Nos résultats mettent en évidence l'identité de l'encombrement moléculaire des différentes isozymes et la liaison des locus. Ces observations peuvent être interprétées comme résultant de la duplication d'un gène ancestral, phénomène observé chez de nombreuses espèces, aussi bien chez les vertébrés (MALACINSKI & RUTTER, 1969 ; KARN & MALACINSKI, 1978) que les invertébrés, Insectes (PAIGEN, p. 23-28, *in* SCANDALIOS, 1979), Mollusques (SCHEIL & GUNTHER, 1981) ou Crustacés (OXFORD, 1986). Cet auteur décrit chez *Asellus aquaticus* 6 locus amyliques dont 5 polymorphes parmi lesquels 3 sont liés. Signalons que nous avons observé 3 zones d'activité amyliques chez les Sphéromes, toutefois la 3<sup>e</sup>, en raison de sa faible réactivité et de son inconstance n'a pu être analysée génétiquement. Le comportement de cette fraction est peut-être à rapprocher des observations réalisées chez les Crustacés amphipodes du genre *Gammarus* (BOROWSKY *et al.*, 1985) chez lesquels des conditions alimentaires et de température différentes permettent « d'induire » l'apparition d'une 3<sup>e</sup> bande.

Pour plusieurs systèmes enzymatiques, nous avons pu inférer la structure quaternaire de la molécule active : monomérique pour les amylases et une estérase, dimérique pour la glucose phosphate isomérase, les phosphatases et une estérase. On note que les structures quaternaires des protéines étudiées sont identiques à celles rapportées chez les Crustacés par HEDGECOCK *et al.* (*in* ABELE, 1982, p. 283-403). Ceci est en accord

avec l'hypothèse de RUTH & WOLD cités par HEDGECOCK *et al.* (in ABELE, 1982, p. 283-403) selon laquelle « la composition en sous-unités des protéines homologues est de type conservatif chez les organismes supérieurs ».

Si dans de nombreux cas, l'homologie des différentes fractions est facilement établie pour les espèces d'un genre, il n'en est pas de même lorsque de nombreuses isozymes sont révélées. L'analyse des croisements intra- et interspécifiques constitue la méthode d'analyse la plus sûre pour l'établissement des homologies moléculaires, préalable nécessaire à l'évaluation des distances génétiques (LAULIER, à paraître).

Reçu le 15 octobre 1986.

Accepté le 4 mai 1987.

### Remerciements

L'auteur remercie les lecteurs mandatés par la revue pour leurs critiques et suggestions lors de la lecture du manuscrit.

### Références bibliographiques

- ABELE L.G., 1982. *The biology of Crustacea (2), embryology, morphology and genetics*. 440 p., Academic Press, New York.
- BARLOW J., RIDGWAY G.J., 1971. Polymorphisms of esterase isozymes in the American lobster (*Homarus americanus*). *J. Fisch. Res. Board Can.*, **28**, 15-21.
- BISOL P.M., BATTAGLIA B., BOVO G., 1977. Polimorfismi enzimatici in *Gammarus insensibilis*. 2. Controllo genetico e caratterizzazione delle esterasi. *Atti Accad. Naz. Lincei*, **62**, 261-266.
- BISOL P.M., PASQUALI P., VAROTTO V., 1981. Formal genetics of two loci, AP-1 and PGI-1 in the marine copepod *Tisbe holothuriae*. *Vie Milieu*, **31**, 293-295.
- BOROWSKY R., BOROWSKY B., MILANI H., GREENBERG P., 1985. Amylase variation in the salt marsh amphipod, *Gammarus palustris*. *Genetics*, **111**, 311-323.
- BREWER G.J., 1970. *Introduction to isozyme techniques*. 186 p., Acad. Press, New York.
- CACCONE H., COBOLLI-SBORDONI M., DE MATTHAEIS E., SBORDONI V., 1978. Una datazione su base genetico-molecolare della divergenza tra specie cavernicole e marine di Sferomidi (gen. *Monolistra* e *Sphaeroma*, Crustacea, Isopoda). *Lav. Soc. Ital. Biogeogr. Nuova Serie*, VII, 853-867 (pubblicato 1982).
- CARIOU M.L., 1977. *Recherches sur le polymorphisme enzymatique du complexe Jaera albifrons, Leach (Crustacé, Isopode)*. Thèse de Doctorat d'Etat, Université de Paris VI.
- EDWARDS J.P., HEATH D.J., 1983 a. Dynamics of an enzyme polymorphism in the Isopod, *Sphaeroma rugicauda* (Leach). 1. Temporal variation in genotype frequencies. *Heredity*, **51**, 467-475.
- EDWARDS J.P., HEATH D.J., 1983 b. Dynamics of an enzyme polymorphism in the Isopod, *Sphaeroma rugicauda* (Leach). 2. Sexual, gametic and fecundity selection. *Heredity*, **51**, 477-486.
- GILARD J.P., 1984. *Contribution à l'étude du polymorphisme enzymatique d'Idotea balthica Pallas (Crustacé Isopode Valvifère)*. Thèse de 3<sup>e</sup> cycle, Poitiers.
- KARN R.C., MALACINSKI G.M., 1978. The comparative biochemistry, physiology and genetics of animal amylases. *Adv. Comp. Physiol. Biochem.*, **7**, 1-103.

- KERAMBRUN P., 1970. Mise en évidence des estérases après électrophorèse sur gel de polyacrylamide chez *Idotea balthica*, *Ligia italica*, *Sphaeroma serratum*, *Sphaeroma hookeri* et *Sphaeroma ghigii* (Crustacés Isopodes). *C.R. Acad. Sci.*, **271**, 428-441.
- KERAMBRUN P., 1974. *Etude de la variabilité biochimique et génétique de Sphaeroma ghigii, S. hookeri et S. serratum (Isopodes Flabellifères)*. Thèse de Doctorat d'Etat, Faculté des Sciences de Marseille-Luminy.
- KERAMBRUN P., 1975 a. Variabilité biochimique et génétique de *Sphaeroma ghigii*, *S. hookeri* et *S. serratum*. Comparaison interspécifique. *Biochem. Syst. Ecol.*, **3**, 95-100.
- KERAMBRUN P., 1975 b. Variabilité biochimique et génétique de *Sphaeroma ghigii*, *S. hookeri* et *S. serratum*. Variations intraspécifiques. *Biochem. Syst. Ecol.*, **3**, 101-109.
- LAULIER M., 1979. Etude comparative de l'analyse électrophorétique des estérases pour cinq espèces du genre *Sphaeroma* : *S. hookeri*, *S. rugicauda*, *S. monodi*, *S. serratum* et *S. teissieri*. *Cah. Biol. Mar.*, **20**, 417-429.
- LAULIER M., 1981. Analyse électrophorétique des systèmes estérasiques chez les hybrides interspécifiques entre trois espèces du genre *Sphaeroma*, *S. monodi* Bocquet, Hoestlandt, Levi, *S. rugicauda* Leach et *S. hookeri* Leach (Isopodes Flabellifères). *Cah. Biol. Mar.*, **22**, 165-175.
- LAULIER M., 1984. *Essai de génétique et de systématique évolutives de trois espèces du genre Sphaeroma Latreille (Isopodes Flabellifères). Etude du complexe d'espèces interfertiles S. levii Argano, S. hookeri Leach et S. rugicauda Leach*. Thèse de Doctorat d'Etat, Université du Mans.
- LAULIER M., LEJUEZ R., 1976. Etude comparative de l'analyse électrophorétique de la lactate NAD oxydoréductase pour cinq espèces de Sphéromes *Sphaeroma serratum*, *S. monodi*, *S. teissieri*, *S. rugicauda* et *S. hookeri*. *C.R. Acad. Sci. Paris*, **283**, 1779-1781.
- LAULIER M., LEJUEZ R., 1977. Analyse électrophorétique de la lactate NAD oxydoréductase chez les hybrides interspécifiques entre trois espèces du genre *Sphaeroma* : *S. monodi*, *S. rugicauda* et *S. hookeri hookeri*. *C.R. Acad. Sci. Paris*, **284**, 2535-2537.
- LEGRAND-HAMELIN E., SOUTY C., PICAUD J.L., 1982. Le polymorphisme de la lactate déshydrogénase dans les sous-espèces d'*Idotea balthica*. *Biochem. Syst. Ecol.*, **10**, 79-81.
- LEJUEZ R., 1966. Comparaison morphologique, biologique et génétique de quelques espèces du genre *Sphaeroma* Latreille (Isopodes Flabellifères). Etude de *S. serratum* (Fabricius), de *S. monodi* Bocquet, Hoestlandt, Levi, de *S. bocqueti*, Daguette de Hureaux, Hoestlandt, Lejuez, de *S. rugicauda* Leach et de *S. hookeri* Leach. *Arch. Zool. Exp. Gen.*, **107**, 469-668.
- LOMHOLT B., CHRISTENSEN B., 1970. Amylase polymorphism in the waterbug, *Asellus aquaticus* revealed by cellulose acetate electrophoresis. *Hereditas*, **64**, 177-180.
- MALACINSKI G.M., RUTTER W.J., 1969. Multiple molecular forms of the  $\alpha$ -amylase from the rabbit. *Biochemistry*, **8**, 4382-4390.
- MAURER H.R., 1971. *Disc electrophoresis and related techniques of polyacrylamide gel electrophoresis*. 222 p., De Gruyter, Berlin.
- OXFORD G.S., 1986. Multiple amylase loci in *Asellus* (Crustacea : Isopoda) : genetics and linkage. *Hereditas*, **56**, 105-110.
- RUVINSKY A.O., LOBKOV Y.I., 1981. Esterase genes in *Daphnia pulex* : linked inheritance and genotypic distribution in natural populations. *Theor. Appl. Genet.*, **60**, 113-117.
- SASSAMAN C., 1979. Genetics of the malate dehydrogenase isozymes of the isopod *Porcellio scaber*. *J. Exp. Zool.*, **210**, 507-513.
- SBORDONI V., CACCONE E., DE MATTAIS E., COBOLLI-SBORDONI M., 1980. Biochemical divergence between cavernicolous and marine Sphaeromidae and the Mediterranean salinity crisis. *Experientia*, **36**, 48-50.
- SCANDALIOS J.G., 1979. *Physiological genetics*. 280 p., Academic Press, New York.
- SCHEIL H.G., GUNTHER A., 1981. Amylases in *Dreissena polymorpha*. Pall. (Mollusca : eulamellibranchia) ; evidence for two polymorphic systems. *Zool. Ann.*, **207**, 120-122.
- SHAW C.R., PRASAD R., 1970. Starch gel electrophoresis of enzymes. A compilation of recipes. *Biochem. Genet.*, **4**, 297-320.
- SOLIGNAC M., CARIOU M.L., 1974. Données génétiques et structurales sur la lactate déshydrogénase dans la super-espèce *Jaera albifrons*. *Biochem. Syst. Ecol.*, **2**, 97-101.